POLYACRYLAMID–GEL ALS TRÄGERSUBSTANZ VON NÄHRBODEN

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von

KIM–CHOON SEAH

(Charles SOEKICHOACHMAN)

Saarbrücken

1972

Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität des Saarlandes
Direktor: Prof. Dr.med. Dr.phil. Dipl.chem. W. ZIMMERMANN

POLYACRYLAMID-GEL ALS TRÄGERSUBSTANZ VON NÄHRBODEN

I N A U G U R A L D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung der Doktorwürde der
HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von
KIM-CHOON SEAH
(Charles SOEKICHOACHMAN)

Dekan: Professor Dr.med. KULENKAMPFF
Referent: Professor Dr.med. Dr.phil. Dipl.chem. W. ZIMMERMANN

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Die mündliche Promotion wurde am 17. November 1972 abgelegt.

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG mit geschichtlichem Hintergrund
2. PROBLEMATIK
3. MATERIAL UND METHODEN
31. Materialien
311. PAA-Bestandteile
312. Eigenschaften der Ausgangsstoffe für die Polyacrylamid-Gel-Herstellung
313. Nährbodenbestandteile
314. Geprüfte Keimarten
32. Methoden
321. Ansätze für die Thermopolymerisation
3211. System
3212. System
3213. System
322. Photopolymerisation
323. Anpassung des PAA-Gels als bakteriologischer Nährboden
3231. pH-Einstellung
3232. Komplette Nährböden
32321. Änderung der Bouillon-Konzentration
32322. APOS-Neutralisation mit Natriumsulfit
32323. Temperaturabhängigkeit

4. ERGEBNISSE

41. Vollsynthetischer Nährboden

42. Nährboden für die Resistenzbestimmung von Antibiotika

43. " Blutplatte "

44. Nährboden mit Häminzusatz

45. Nährboden zum Anzüchten von Hämophilus influenzae

46. Indikatorplatten

461. Endoplatte

4611. Methode

4612. Methode.

4613. Methode.

462. Brillantgrünplatte

463. Phenolrotplatte

464. Bromthymolblau-Platte

4641. " Medium für Citratverwertung "

4642. " Zucker-Bouillon-Indikator-Gemisch für die Bunte Reihe "

5. DISKUSSION

6. ZUSAMMENFASSUNG

7. LITERATURVERZEICHNIS

8. DANKSAGUNG

9. LEBENSLAUF

Zum Andenken

an meine Eltern

und

meine Brüder

1. EINLEITUNG mit geschichtlichem Hintergrund

Seit der Einführung von Gelatine und Agar für die Herstellung fester Nährböden in der bakteriologischen Diagnostik durch Robert Koch und seinen Mitarbeiter Walter Hesse (1881 - 1883) wurden keine besseren Substanzen gefunden, die den Agar hätten ersetzen können. Während der beiden Weltkriege und in den Nachkriegszeiten machte sich der Mangel des aus Ostasien stammenden Rohagars unangenehm bemerkbar. Dies ist auch ein Grund dafür, dass man seit langem bemüht ist, Substanzen zu finden, die weitgehend dieselben Eigenschaften besitzen wie Agar.

Mit Kieselsäuregallerte, einer anorganischen Substanz als Agarersatz, arbeitete zuerst Kühne(22)+ -1890, später Sleskin(39)+, Wingradsky und Bojanowsky(45)+ -1891, Seuth -1898, Schwarz(37)+, Hanks und Weintraub(17)+ -1935, sowie Hettche(18)+, Batchelor(3)+ und Wilson -1937, Wahl(43)+ -1938. Gildemeister(12)+, Attz(1)+ und Hettche -1935 versuchten durch Aufbereitung gebrauchter Nährböden neue gebrauchsfähige Platten herzustellen. Denselben Versuch unternahmen Bartel und Marwyck(2,24)+ -1942. Wohlfeil(48)+ -1947 veröffentlichte eine Arbeit über Kieselsäurenährböden zu diagnostischen Zwecken.

Es wurden auch organische Substanzen als Agarersatz beschrieben, beispielsweise regte Smith(41)+ in seiner Arbeit 1898 stärkehaltige Nährböden an. Noch 1906 demonstrierte Smith(40)+ Kulturen auf Stärkegel und auf Silikatgel. Als gelierendes Prinzip wurde Stärke jedoch erst

---

( )+ Nr. des Literaturverzeichnisses

1938 und 1939 von Zimmermann[49,50]+ in ausgedehnten Versuchsreihen beschrieben. Göpel[14]+ 1940 erprobte Stärkeplatten auf der Varia und Typhusstation. Durch Zusatz von wasserlöslichen Zellulosederivaten wurde von Zimmermann[52]+ 1943 etwa 60 - 70 % Agareinsparung demonstriert.

Über die Erfahrungen mit Stärke- und Zellulosenährböden, vor allem bei der Diagnostik der TPE-Gruppe, berichtete Zimmermann[53]+ im Jahre 1947. Polyvinylalkohol wurde von Schütz[38]+ 1937 auf der Tagung in Berlin demonstriert. 1939 fand Zimmermann[51]+ heraus, dass Polyvinylalkohol allein durch Konzentrationserhöhung genügend harte Platten liefert. Mehlitz 1930 und Wohlfeil[47]+ 1937, Funk[10]+ benutzten bei ihren Versuchen Pektine und ähnliche Produkte. Ebenfalls 1937 züchteten Galloway[11]+ und Dusseau 1938 Pilzkulturen auf Cellophanfolien. Kisskalt[21]+ 1943 und Kanz[19]+ 1948 gelang die Züchtung von Bakterien auf Cellophanfolien. Eick[6]+ versuchte Einsparung von Agar durch Zusatz von Polyvinylpyrrolidon.

Agar aus einheimischen Algen besitzt nach Kirschninck[20]+ 1949 eine etwas dunklere Farbe, ist schwerer löslich und hat eine schwache Gelierkraft. In Dänemark wird ein dem Agar fast gleichwertiges Produkt unter dem Namen " Danagar " von Fischer[9]+ und Mühlens[27]+ hergestellt. Die Erstarrungstemperatur (63° C) ist jedoch zu hoch.

2. PROBLEMATIK

Eine Trägersubstanz für bakteriologische Nährböden sollte folgende Eigenschaften besitzen:

1) Ungiftigkeit für Bakterien
2) Giessbarkeit
3) Schnittfeste Gelbildung
4) Unveränderlichkeit der Konsistenz bei 37° C
5) Schmelzbarkeit bei höheren Temperaturen
6) Durchsichtigkeit
7) Elastizität
8) Nichtklebende Oberfläche
9) Hydrophile Eigenschaften
10) Neutrale Reaktion
11) Leichte Sterilisierbarkeit
12) Krisenfeste Beschaffungsmöglichkeit.

Von diesen zwölf Forderungen erfüllt selbst Agar nur elf, denn in Krisenzeiten ist er nach früheren Erfahrungen nicht in genügender Menge zu beschaffen.
In der vorliegenden Arbeit soll geprüft werden, ob Polyacrylamidgel als Trägersubstanz bakteriologischer Nährböden Verwendung finden kann.
Die an der Polymerisation des Polyacrylamidgeles (PAA) beteiligten Komponenten sind üblicherweise nicht im ultrareinen Zustand zu erhalten, einige schädigen das Bakterienwachstum, wie Ammoniumperoxosulfat. Es muss geprüft werden, inwieweit diese Komponenten, die nach der Polymerisation z.T. ungebunden vorliegen, entfernt oder neutralisiert werden können.
Um die Sterilität der Trägersubstanz zu gewährleisten, müssen Massnahmen ergriffen werden, die eine bakterielle Kontamination verhindern oder erneut sterile Verhältnisse schaffen.

3. MATERIAL UND METHODEN

31. Materialien

311. PAA-Bestandteile

Acrylamid monomer zur Synthese (C_3H_5NO)	(Merck)
N,N' - Methylenbisacrylamid (BIS)	(Serva)
N,N,N',N' - Tetramethyläthylendiamin (TMED)	(Serva)
Ammoniumperoxodisulfat (APOS)$(NH_4)_2S_2O_8$	(Serva)
Riboflavin ($C_{17}H_{20}N_4O_6$)	(Serva)
Natriumsulfit (Na_2SO_3)	(Merck)

312. Eigenschaften der Ausgangsstoffe für die Polyacrylamidgelherstellung (Tabelle 1.)

Polyacrylamidgele (PAA-), die in der Elektrophorese und Chromatographie seit einiger Zeit eine wichtige Rolle spielen, werden einmal hergestellt aus Acrylamid (Monomer)(C_3H_5NO):

$$(CH_2 = \underset{\underset{NH_2}{|}}{\underset{CO}{\underset{|}{CH}}})_x$$

und geeigneten Vernetzern, wie N,N-Methylenbisacrylamid (BIS) $CH_2 = CH{-}CO{-}NH{-}CH_2{-}NH{-}CO{-}CH = CH_2$ oder Dimethylaminoproprionitril.

Für den Polymerisationsvorgang ist weiterhin ein Kopolymerisationssystem erforderlich. Solche Systeme können aus einem Gemisch von Tetramethyläthylendiamin (TMED) und Ammoniumperoxodisulfat (APOS) bzw. Riboflavin bestehen. Je nach dem verwendeten Komponenten kommt es unter Wärme oder Lichteinwirkung (Tageslicht) zu einer Polymerisation. Die entstandenen Polyacrylamidgele unterscheiden sich in Konsistenz und Transparenz.

Durch Abwandlung der Mischungsverhältnisse können Gele mit einem Acrylamidanteil von 3-30 % hergestellt werden. Die Porengrösse schwankt zwischen 50 und 5 Å. Niedrigprozentige Gele sind weich und bei Verwendung der geeigneten Kopolymerisatoren glasklar. Je höherprozentig die Gele sind, desto brüchiger und getrübter erscheinen sie. Für die meisten Verwendungszwecke erweist sich ein Gel in der Konzentration zwischen 5 und 7 % am günstigsten. Mischungen mit einem Anteil von weniger als 2 % Acrylamid polymerisieren nicht mehr.

Tabelle 1.

Eigenschaften der Ausgangsstoffe für die Polyacrylamidgelherstellung - nach H. Rainer Maurer(31)+

Eigenschaften	Acrylamid	N,N'-Methylen-bisacrylamid	N,N,N',N'-Tetramethyl-äthylendiamin	Ammoniumper-oxosulfat	Riboflavin 6,7-Dimethyl-9(D-1'ribityl)-isoallaxazin
Formel	CH_2=CH-CO-NH_2	CH_2=CH-CO-NH / CH_2 / CH_2=CH-CO-NH	$(CH_3)_2$N-CH_2 / $(CH_3)_2$N-CH	$(NH_4)_2S_2O_8$	$C_{17}H_{20}N_4O_6$
Mol.Gewicht	71,08	154,16	116,20	228,2	376,4
Aussehen	weisse kristalline Substanz	weisse Kristalle	farblose bis leicht gelbliche Flüssigkeit	weisse krist. Substanz	gelbe Kristallnadeln
Geruch	-	-	ammoniakalisch	ammoniakalisch	-
Löslichkeit (g/ml bei 30° C)	H_2O 2,0 Methanol 1,1 Aceton 0,4 $ChCl_3$ 0,4	H_2O 0,31 (20° C)	mischbar mit H_2O und organischen Lösungsmitteln	sehr leicht löslich in H_2O (100 Tl. H_2O lösen bei 20° C 65 Tl. A)	schwerlöslich in H_2O, in NaOH unter Salzbildung löslich, in Äthanol unlöslich
F bzw. Kp (°C)	84,5 ± 0,3	185 unter Polymerisation	120-122	-	280°
Dichte	1,122 (D_4^{30})	-	0,777 (D_4^{20})	-	-
Berechnungsindex (n_4^{20})	-	-	1,14184 ± 0,0005	-	-
Veränderung bei Aufbewahrung	langsame, spontane Polymerisation	langsame, spontane Polymerisation	Gelbfärbung	bei Anwesenheit von Feuchtigk. rasch Zerfall unter O_2 Abgabe	-
Darstellung	(4,36)+	(8)+	(23,33)+	(34)+	(33)+

313. Nährbodenbestandteile:

Pepton aus Fleisch und Casein tryptisch verdaut zu gleichen Teilen gemischt, Fleischextrakt trocken, Hefeextrakt gepulvert wurden von "Merck" bezogen. Fleischextrakt "Lab Lemco" (Oxoid L-30) wird in Deutschland von der Firma "Nährböden und Chemie" vertrieben. Salze wie Natriumchlorid, Phosphate und andere wurden von "Merck" bezogen.
Hämin (Krist.purum), L-Histidin, Triäthanolamin (Karl Roth OHG, Karlsruhe), NAD (Boehringer, Mannheim) und Brain Heart Infusion (Difco Laboratories, USA) wurden für die Herstellung eines Spezialmediums zum Wachstum von Hämophilus influenzae benötigt.

314. Geprüfte Keimarten

Es wurden bei den Versuchen folgende Keimarten untersucht:
Enterobakteriaen (E.coli, hämolysierende Coli, Proteus, Salmonella), Klebsiella, Pseudomonas, Alcaligenes, Streptokokken (A- und D-Streptokokken), Staphylokokken und Hämophilus influenzae.

32. Methoden

321. Ansätze für die Thermopolymerisation

Im Verhältnis 1:2:1:4 werden gemischt

a) TMED 0,46 ml ad 100 ml Aqua dest.

b) Acrylamid 60 g, BIS 0,4 g ad 100 ml Aqua dest.

c) Aqua dest.

d) APOS 0,5 g ad 100 ml Aqua dest.

und in Petrischalen ausgegossen. Die Polymerisation ist bei Zimmertemperatur innerhalb einer Stunde abgeschlossen. Die Oberfläche des Polymerisats ist uneben und trocken. Diffusion des Gels für 6 - 12 Stunden bei Zimmertemperatur im Autoklaven bei 121° C mit einer Bouillon führt noch nicht zu Nährböden, auf denen z.B. E.coli anzüchtbar ist. Die unebene Oberfläche erschwert das Ausstreichen. Geeignete PAA-Nährböden lassen sich nach den Versuchen nach folgenden Methoden herstellen:

3211. Es werden vor allem die Polymerisationslösungen etwa auf 10° C abgekühlt und deren pH auf 7,4 eingestellt. Im Verhältnis 1:2:1:4 werden gemischt:

a) TMED 1,0 ml ad 100 ml Aqua dest.

b) Acrylamid 20,0 g, BIS 1,1 g ad 100 ml Aqua dest.

c) Aqua dest.

d) APOS 1,6 - 1,8 g ad 100 ml Aqua dest.

Die Mischung wird in Petrischalen gegossen.

Nach 1 - 2 Minuten setzt die Polymerisation ein, die Oberfläche ist glatt und mit etwas Flüssigkeit bedeckt. Nach jeweils 2-3-maliger, 2- oder mehrstündiger Inkubation mit 0,9 - 2,8 %iger Na_2SO_3-Lösung ist der Hemmstoff Ammoniumperoxodisulfat neutralisiert.

Um sterile Platten zu bekommen, werden die Gele noch bei 121° C, 1 atü 30 Minuten autoklaviert, dabei verändert sich die glatte Oberfläche nicht wesentlich. Zum Teil wird der Rand der Gele beim Autoklaven hochgezogen. Werden diese Gele zusammen mit Bouillon autoklaviert, oder werden die Polymerisationskomponenten in Bouillon angesetzt, so lassen sich anspruchslose Keime darauf anzüchten.

3212. Im Verhältnis 2:2:5,5 werden gemischt:

a) TMED 4,5 ml ad 500,0 ml Aqua dest.

b) Acrylamid 120 g, BIS 3,0 g ad 500 ml Aqua dest.

c) APOS 1,6 - 1,8 g ad 500 ml Aqua dest.

und dann in eine rechteckige Form (200 x 300 x 7 mm) gegossen. Nach 5 - 10 Minuten erfolgt die Polymerisation. Das Gel wird für 3 - 4 Tage in destilliertes Wasser eingelegt. Dieses wird zweimal gewechselt. Auf diese Weise können Hemmstoffe aus dem Gel herausdiffundieren. Anschliessend wird das Gel in eine KH_2PO_4/NaOH-Pufferlösung mit einem pH-Wert von 7,2 - 7,4 überprüft. Mit einer scharfrandigen Kunststoffpetrischale werden runde Gelstücke herausgestanzt. Diese werden mit je 5 ml Bouillon bei 121° C, 1 atü für 30 Minuten autoklaviert. Nach dieser Behandlung ist das Gel für die weitere Verwendung bereit.

3213. Im Verhältnis 1:2:1:1:3 werden gemischt

a) TMED 1,0 ml ad 100 ml Aqua dest.
b) Acrylamid 22 g, BIS 1,1 g ad 100 ml Aqua dest.
c) Aqua dest.
d) APOS 1,6 - 1,8 g ad 100 ml Aqua dest.
e) Natriumsulfit 1,6 - 1,8 g ad Aqua dest.

und die Mischung in Petrischalen gegossen. Dabei entsteht ein Gel mit glatter Oberfläche, das mit etwas Flüssigkeit bedeckt ist.
Um ein vorzeitiges Polymerisieren zu verhindern, sollten die Lösungen b) und d) zum Schluss zur Polymerisationslösung hinzugegeben werden. Die pH-Einstellung erfolgt nach der Polymerisation. Hierzu ist es günstig, exakt gleiche Mengen Gel pro Petrischale einzufüllen.

322. Photopolymerisation

Es werden im Verhältnis 1:2:1:4 gemischt

a) TMED 0,25 ml ad Bouillon 100 ml
b) Acrylamid 24 g, BIS 1,5 g ad 100 ml Bouillon
c) Riboflavin 5,0 mg ad 100 ml Bouillon
d) Bouillon (bestehend aus: Pepton 1,5 g, NaCl 0,9 g, Fleischextrakt "Lab Lemco" 1 g, ad 100 ml Aqua dest.)

und die Mischung in Petrischalen ausgegossen. Tageslicht ausgesetzt. Selbst nach mehreren Stunden kommt es zu keiner Polymerisation. Durch die Erhöhung des Katalysators Riboflavin von 5 mg auf 10, 20 und 200 mg kann ebenfalls keine Polymerisation erreicht werden. Die dunkle Farbe der Bouillon dürfte hierbei eine Rolle spielen. Die Substanzen werden nun in Aqua dest. statt Bouillon gelöst; nach einer Stunde

kommt es zur Polymerisation. Die Oberflache glatt und mit Flüssigkeit bedeckt. Die Platten werden mit Bouillon zur Diffusion überschichtet und autoklaviert. Nach Beimpfen mit E.coli, Proteus, Klebsiella und Pseudomonas zeigt sich Wachstum, die Kolonien sind sehr klein.

323. Anpassung des PAA-Gels als bakteriologischer Nährboden

3231. pH-Einstellung

Um ein gutes Wachstum der Bakterien zu erreichen, muss auf deren pH-Optimum eingestellt werden. Bei Messungen der Polymerisationslösung vor und nach der Polymerisation ergeben sich unterschiedliche pH-Werte.

Tabelle 2.

pH-Werte der Polymerisationslösungen vor und nach der Polymerisation (entsprechend 3213.).

Lösungen	pH der Einzellösungen vor der Polymerisation	pH des Polymerisats
a)	11,0	
b)	4,0	
c)	5,6	) 11,4
d)	3,3	
e)	9,9	
a)	7,4	
b)	7,4	
c)	(5,6)	) 9,6
d)	7,4	
e)	7,4	

Da der pH-Wert des Gels nach der Polymerisation im alkalischen Bereich liegt, wird mit Phosphorsäure nachgestellt. Um ein Polymerisat von 16 ml auf ein pH um 7 zu bringen, sind folgende Mengen einer 4,25 %igen Phosphorsäure erforderlich:

Tabelle 3.

Die benötigte Phosphorsäuremenge bei der bestimmten pH-Einstellung.

PAA-Platte (16 ml) pH-Messung	4,25 %ige H_2PO_4-Menge (24 Tr. entspricht 1 ml)	pH vor Autoklav./ pH nach Autoklav.
11,4	5 Tropfen	7,8 / 7,75
11,4	6 Tropfen	7,4 / 7,35
11,4	7 Tropfen	6,9 / 6,85
11,4	8 Tropfen	6,6 / 6,55

3232. Komplette Nährböden

32321. Änderung der Bouillon-Konzentration

Die Bouillon- und die Natriumsulfitbehandlung des PAA-Gels sind für das Keimwachstum ebenso erforderlich wie die pH-Korrektur der PAA-Platten.
Der pastenartige Fleischextrakt als Grundstoff der Bouillon erweist sich bezüglich der Polymerisation und des Bakterienwachstums weniger geeignet als trockener.

Tabelle 4.

Zusammensetzung der Bouillon in Beziehung zur Koloniengrösse von E.coli.

Bouillon aus .... ad 100 ml Aq.		Beimpfen mit E.coli		Beimpfen mit E.coli		Beimpfen mit E.coli
Pepton F.p. NaCl	1,5 g 0,5 g 0,5 g	++	1,5 g 1,0 g 0,5 g	++	2,0 g 1,5 g 0,9 g	+++
Pepton F.tr. NaCl	1,0 g 0,5 g 0,5 g	+	1,5 g 1,0 g 0,5 g	++	2,0 g 1,5 g 0,9 g	+++
Pepton NaCl	1,0 g 0,5 g	±	1,5 g 0,9 g	+	2,0 g 0,9 g	++
F.P. NaCl	1,0 g 0,5 g	±	1,5 g 0,9 g	+	2,0 g 0,9 g	+++
Pepton H.e. F.p.	0,6 g 0,3 g 0,15 g	+	1,0 g 0,9 g 0,5 g	++	1,5 g 0,9 g 0,9 g	+++

Erläuterungen zur Tabelle:

- Pepton = Fleisch- und Caseinpepton, trytisch verdaut, 1:1 gemischt;
- F.p. = Fleischextrakt Lab Lemco (pastenförmig);
- F.tr. = trockener Fleischextrakt;
- H.e. = Hefeextrakt;
- Aq. = Aqua dest.
- ± = schlechtes Wachstum, Koloniendurchmesser $<$ 1 mm
- \+ = gutes Wachstum, Koloniendurchmesser 1 mm
- ++ = sehr gutes Wachstum, Koloniendurchmesser 1,5 - 2 mm
- +++ = verwaschenes Wachstum, Koloniendurchmesser $>$ 2 mm.

32322. APOS-Neutralisation mit Na_2SO_3

Tabelle 5.

Die Anpassung der PAA-Platten für das Bakterienwachstum (E.coli) durch Behandlung mit Natriumsulfitlösungen verschiedener Konzentrationen und in Abhängigkeit vom Wechsel.
Nach der Natriumsulfitbehandlung wurde mit Bouillon diffundiert.

Na_2SO_3 Konz.	PAA-Platte nach 1, 2, 3 x Diffusion und Beimpfen mit E.Coli 1 x	2 x	3 x
0,9 g%	-	-	+
1,2 g%	-	-	+
1,8 g%	-	+	++
2,8 g%	+	++	++
3,2 g%	-	-	-
4,0 g%	-	-	-
5,0 g%	-	-	-
6,0 g%	-	-	-
10,0 g%	-	-	-

Bemerkungen:

- − = kein Wachstum
- + = gutes Wachstum
- ++ = sehr gutes Wachstum

32323. Temperaturabhängigkeit

Die Agar-Platten, die aus flüssigem, heissem Agar-Agar und Bouillon hergestellt werden, können nach dem Erstarren wieder durch Hitze verflüssigt werden. Die PAA-Platten verlangen eine andere Behandlung. Die Polymerisationskomponenten sollten vor der Polymerisation auf etwa 10° C abgekühlt werden, nach Polymerisation kann autoklaviert werden, wobei das Gel fest bleibt. Eine nachträgliche Verflüssigung ist durch Temperaturerhöhung nicht möglich. Dies ist bei Vernichtung zu berücksichtigen.

4. Ergebnisse

41. Vollsynthetischer Nährboden

Salzgemisch für das Wachstum von E.coli (pH 7,2)

$Na_2H\ PO_4$.	$12\ H_2O$	5,0 g
KH_2PO_4		4,5 g
Fe_2SO_4 .	$7\ H_2O$	Spur
$CaCl_2$		50,0 mg
NH_4Cl		1,0 g
$MgSO_4$.	$7\ H_2O$	300,0 mg

Diese Salze werdon in 950 ml Aqua dest. gelöst und autoklaviert. Danach werden 10 g Glucose pro 50 ml dest. Wasser steril filtriert und zugegeben.
Für die PAA-Platten werden die Polymerisationslösungen statt mit Aqua dest. mit dieser Salzlösung angesetzt. Nach dem pH-Einstellen und Autoklavieren zeigt E.coli Wachstum. Die Kolonien sind vergleichsweise klein. Auch Klebsielle, Proteus und Pseudomonas wachsen auf diesen Nährböden.

42. Nährboden für die Resistenzbestimmung von Antibiotika

Die verwendete Nährlösung besteht aus:

Pepton	3,0 g
Hefeextrakt	1,5 g
Fleischextrakt (trocken)	0,75 g
Aqua dest. ad	500,0 ml

Diese wird autoklaviert und hat einen pH-Wert von 7,2. Diese Nährlösung ersetzt das destillierte Wasser der Polymerisationslösungen (System 3211 - 3213). Nach der Polymerisation wird nochmals autoklaviert.

Tabelle 6.

Das Beimpfen mit verschiedenen Keimen zeigt im Vergleich zur Agarplatte keinen grossen Unterschied. Auf der Agarplatte und der PAA-Platte ist der Hemmhof um die Sulfonamide gleich unscharf umrissen.

Multodisk Code 1461 S für E.k.			Multodisk Code 2631 für Gram negative Stäbchen							Multodisk Code 1460 E für Staph.aureus		
				E.coli		Pr.		Ps.				
	A.	P.		A.	P.	A.	P.	A.	P.		A.	P.
	mm	mm		mm	mm	mm	mm	mm	mm		mm	mm
F	17	17	G	15	14	10	10	7	7	G	8	7
PN	13	14	PN	34	35	31	29	-	-	P	9	10
TE	10	11	TE	11	11	11	12	12	13	OB	14	14
C	15	14	C	22	23	21	19	-	-	TE	23	24
E	25	23	CS	12	13	-	-	24	24	C	16	15
KF	20	20	KF	25	24	30	30	-	-	E	17	18
Py	15	16	F	12	12	12	13	-	-	KF	30	31
NC	23	23	Na	20	19	21	22	-	-	FD	24	24
SXT	20	21	Py	12	11	16	15	19	18			
U	24	23	U	22	22	14	14	-	-			
			SXT	25	26	18	17	-	-			
			NC	12	13	21	22	25	26			
			Rb	22	21	-	-	23	22			

Erläuterung zu den Abkürzungen:

E.k.	=	Enterokokken	Py	=	Carbenicillin
Pr.	=	Proteus	NC	=	Nicine
Ps.	=	Pseudomonas	SXT	=	Eusaprin
A.	=	Agarplatte	U	=	Urospasmon
P.	=	PAA-Platte	G	=	Sulfonamid
F	=	Nitrofurantoin	Cs	=	Colistin
PN	=	Ampicillin	Na	=	Nalidixinsäure
TE	=	Tetracycline	Rb	=	Gentamycin
C	=	Chloramphenicol	P	=	Penicillin G
E	=	Erythromycin	OB	=	Cloxacillin
KF	=	Cephalosporin	FD	=	Fusidinsäure

43. "Blutplatte"

Polymerisationslösungen nach System 3211 werden mit 5 - 10 ml Hammelblut versetzt und polymerisiert. Diese Platten zeigen eine glatte Oberfläche, sie sind durchsichtig (hämolytisch) und dunkelbraun verfärbt.

Tabelle 7.

Die einzelnen Lösungen werden in ihrem Verhalten gegenüber Blut in folgenden Ansätzen getestet:

Hammelblut	Lösungen	Farbänderung	Hämolyse
2 Tropfen	5 ml Bouillon	hellrot durchscheinend	keine
2 Tropfen	5 ml TMED	hellrot durchsichtig	ja
2 Tropfen	5 ml Acrylamid +BIS	hellrot durchsichtig	ja
2 Tropfen	5 ml Aqua dest.	hellrot durchsichtig	ja
2 Tropfen	5 ml Na_2SO_3 (2,8 %)	hellrot durchscheinend	keine
2 Tropfen	5 ml $(NH_4)_2S_2O_8$	dunkelbraun durchsichtig	ja

Bei weiteren Versuchen werden die nach System 3211 hergestellten Platten mit Bouillon und Na_2SO_3 (2,8 g%) unter Wechsel überschichtet. Anschliessend werden 10 Tropfen Hammelblut auf der Oberfläche verteilt.

Tabelle 8.

Wachstum und Plattenfärbung nach verschiedener Vorbehandlung der PAA-Platten

Platten mit Vorbehandlung und Zusatz von	Farbe	Beimpfen mit St.aureus
Bouillon + 10 Tr. Hammelblut	dunkelbraun	kein Wachstum
Na_2SO_3(2x)+ 10 "	hellrot	gutes Wachstum
Na_2SO_3(1x)+ 10 "	dunkelbraun	gutes Wachstum

Obwohl auf den "Blutplatten" Wachstum nachweisbar ist, ist um Kolonien von St.aureus ein Hämolysehof nicht erkennbar. Es ist anzunehmen, dass die Poren der fertigen PAA-Platten zu klein sind, um Hammelerythrozyten intakt eindringen zu lassen.

Um die entsprechende Porengrösse für die Diffusion der Hammelerythrozyten zu erhalten, wird unter Verringerung der Konzentration wie folgt geändert:

Im Verhältnis 1 : 1 : 2 werden gemischt:

a) TMED 1 ml ad 100 ml Bouillon
b) Acrylamid 14 g, BIS 1,3 g ad 100 ml Bouillon
c) $(NH_4)_2S_2O_8$ 1,4 g ad 100 ml Bouillon

und die Mischung in Petrischalen gegossen.

Dabei entsteht ein Gel mit glatter Oberfläche, das mit etwas Flüssigkeit bedeckt ist. Nach zweimaligem Überschichten und Wechsel mit 2,8 %iger Na_2SO_3-Lösung wird Hammelblut auf die Oberfläche gegeben.

Die "Blutplatten" sind hellrot gefärbt und nach Beimpfen mit St.aureus sind Bakterienkolonien gewachsen, ein Hämolysehof ist jedoch nicht sichtbar.

44. Nährboden mit Häminzusatz

Um hämophile und sonstige anspruchsvolle Keime wachsen zu lassen, kann Hämin substituiert werden.

Zusammensetzung der Häminlösung:

Hämin	10 mg
L-Histidin	10 mg
4 % Triäthanolaminlösung	10 ml

Die Lösung ist dunkelbraunrot, sie wird sterilfiltriert.

Die Häminplatten werden nach folgender Methode hergestellt:

Nach System 3211 werden die Gele in Petrischalen von 5 cm Durchmesser statt mit Aqua dest. mit Bouillon hergestellt und zweimal mit 2,8 %iger Na_2SO_3-Lösung überschichtet. Danach werden pro Platte 3 Tropfen Häminlösung auf die Gele getropft und verteilt.

Tabelle 9.

Keimwachstum und Farbe der Häminplatten in Abhängigkeit von der Verweildauer der Häminlösung

Zeit nach Hämineinwirkung	Farbänderung nach Hämineinwirkung	Keimwachstum nach 12 Std. Bebrüten			
		St. aureus	Ps.	Coli h.	ß-Str.
2 Std.	leicht gelbgrün	+	+	+	+
4 Std.	leicht gelbgrün	+	+	+	+
12-20 Std.	dunkel olivfarben	++	++	++	++

Erläuterungen zu den Abkürzungen:

Ps. = Pseudomonas
Coli h. = E.coli hämolyticus
ß-Str. = A-Streptokokken
\+ = gutes Wachstum
++ = sehr gutes Wachstum

Nach dem Beimpfen mit den obengenannten hämolysierenden Bakterien oder Bacillus subtilis ist eine Verfärbung um die Kolonien (im Sinne eines Häminabbaues) nicht nachweisbar.

45. Nährböden zum Anzüchten von Hämophilus influenzae

Um das Wachstum von Hämophilus influenzae auf der Agarblutplatte und auf der PAA-Häminplatte zu vergleichen, wurden PAA-Platten nach dem System 3213 hergestellt.

Brain Heart Infusion 3,7 g ad 100 ml Aqua dest. wird nach Auflösen auf einen pH-Wert von 7,2 eingestellt und autoklaviert. Nach dem Abkühlen wird zusätzlich mit NAD-Lösung und Häminlösung (wie oben hergestellt) angereichert, so dass die Endkonzentration 10 γ Hämin pro ml und 2 γ NAD pro ml beträgt.

In jede der obengenannten PAA-Platten werden 5 ml aus der angereicherten Bouillon für 12 Stunden eingefüllt, danach abgegossen. Nach Beimpfen der abgetrockneten Platten mit Hämophilus influenzae entstehen nach 24 Stunden winzige Kolonien ($<$ 1 mm). Im Vergleich zur Agarblutplatte setzt das Wachstum mit etwa 12 Stunden Verspätung ein. Staphyluscoccus aureus wächst bereits nach 12 Stunden zu Kolonien an. Die Kolonien von Hämophilus influenzae, die auf den Platten gewachsen sind, lassen sich wieder auf Blutagarplatten mit Amme überimpfen. Wird bei der Bouillon das NAD weggelassen, so ist mit Staph. aureus Ammenwachstum nachweisbar.

46. Indikatorplatten

461. Endoplatte

4611. Die Endoplatten werden nach Vorschrift (16)+ unter Verwendung von folgender Bouillon hergestellt:

Pepton gemischt	10,0 g
Fleischextrakt	5,0 g
NaCl	5,0 g
Aqua dest. ad	1000,0 ml

Diese wird auf pH 7,4 eingestellt und autoklaviert. Die Polymerisationslösungen des Systems 3211 werden statt in Aqua dest. in dieser Bouillon angesetzt und vor dem Mischen auf pH 7,4 eingestellt. In einigen Fällen wird die Zusammensetzung der Bouillon abgeändert (Tabelle 10.). Danach wird pro 1000 ml die Endo-Indikatorlösung hinzugesetzt.

Die Endo-Indikatorlösung besteht aus:

Laktose	10,0 g
$Na_2SO_3 \cdot 7\ H_2O$	4,0 g
Alkalisch gesättigter Fuchsinlösung	4,0 ml

gelöst in etwa 5 ml Bouillon.

Nach der Polymerisation ist das Gel von weicher Konsistenz und dunkelrosa bis leicht violett verfärbt. Auch nach mehrmaligen Diffusionswaschungen mit Na_2SO_3 (2,8 %ig, pH 7,4)-Lösung wird die Platte nicht ausreichend entfärbt.

Tabelle 10.

Abhängigkeit der Plattenfärbung und des Wachstums von der Bouillonzusammensetzung und der Nachbehandlung

Bouillon Zusammensetzung g / l	Diffusion mit 2,8 % Na_2SO_3	Autoklav. PAA-Pl.	Endo-Indik.	Farbton	Wachstum von E.coli	Farbumschlag
P = 10, F.tr. = 5, NaCl = 5,	3 x	1 x	mit	rosa-violett	++	rot
P = 15, F.tr. = 9, NaCl = 5,	1 x	1 x	mit	leicht	+	rot
P = 10, F.p. = 5, NaCl = 5,	3 x	1 x	mit	rosarot	++	roter Metallglanz

Erläuterungen der Abkürzungen:

P	=	Pepton
F.tr.	=	trockenes Fleischextrakt
F.p.	=	Fleischextrakt "Lab Lemco" pastenförmig
+	=	gutes Wachstum
++	=	sehr gutes Wachstum

4612. In einem anderen Ansatz wird die Endo-Indikatorlösung nicht zu den Polymerisationslösungen hinzugefügt, sondern die bereits polymerisierten Gele werden mit 5 ml Endo-Indikatorlösung für 6 - 12 Stunden überschichtet. Nach dem Abgiessen und Abtrocknen wird die Farbe noch intensiver rot. Die Platten sind als Endoplatten unbrauchbar, da sich trotz Keimwachstum kein Farbumschlag ergibt.

4613. Weiter werden die Platten nach System 3212 oder 3213 hergestellt und mit 5 ml Bouillon (pH 7,4) überschichtet, autoklaviert. Danach gibt man 5 ml Endo-Indikatorlösung in jede Platte. Nach 6- bis 12-stündigem Diffundieren wird die Lösung abgegossen und die Platte getrocknet. Die Platten sind rosa durchsichtig, ähnlich wie Endoagarplatten. Nach dem Beimpfen mit E.coli, Salmonellen, Pseudomonas und anderen Keimen zeigt sich entsprechend der Laktose-Verwertung deutlicher Farbumschlag. Bei E.coli ist jedoch Metallglanz wie auf der Endoagarplatte nicht sichtbar.

Tabelle 11.

Farbänderungen der Platten nach Beimpfen mit Laktose verwertenden und nicht verwertenden Keimen. Die Ausgangsplatten sind rosa gefärbt.

Keime	Farbänderung nach	
	12 Stunden	24 Stunden
E.Coli	Kolonien und Platte sind rot, kein Metallglanz	Verstärkung der Rötung
Proteus	Kolonien und Platte sind rosa (keine Farbänderung)	wie nach 12 Stunden
Salmonella	Kolonien und Platte sind rosa (keine Farbänderung)	wie nach 12 Stunden

462. Brillantgrünplatte

Nach Vorschrift (30)+ wird die Bouillon aus folgenden Reagentien hergestellt:

Pepton	10,0 g
Hefeextrakt	3,0 g
Laktose	10,0 g
Saccharose	10,0 g
NaCl	5,0 g
Aqua dest. ad	1000,0 ml.

Die Substanzen werden nacheinander gelöst und auf pH- 6,9 - 7,0 eingestellt, anschliessend wird autoklaviert. Die PAA-Gele werden nach System 3212 oder 3213 polymerisiert. Nach dem Autoklavieren werden die Platten mit Brillantgrün-Indikatorlösung versetzt. Diese besteht aus:

Phenolrotlösung Merck 7241	1,0 ml	(800 mg / 100 ml)
Brillantgrünlösung	0,12 ml	(1,25 g / 100 ml)
Bouillon ad	100,0 ml	

Jede Platte wird mit 5 ml überschichtet und nach 6 bis 12 Stunden wird abgegossen und abgetrocknet, dann sind sie zum Beimpfen bereit.

Die PAA-Brillantgrünplatte (pH 6,8 - 6,9) ist im Vergleich zu den Agarplatten weniger olivgrün, sondern mehr hellgrün gefärbt. Durch Erhöhung des Brillantgrünanteils wird die Färbung wenig beeinflusst.

Tabelle 12.

Die Farbumschläge der Platten nach Beimpfen mit verschiedenen Keimen.
Bei Verlängerung der Bebrütungszeit von 12 auf 24 Stunden zeigt sich keine Veränderung. Die Ausgangsplatten sind hellgrün gefärbt.

Keime	Bebrütungsdauer nach 12 Stunden
Salmonella typi murium	Gel und Kolonien sind rosa
E. coli	Gel und Kolonien sind hellgrün
Proteus	Gel und Kolonien sind rosa
Pseudomonas	Gel und Kolonien sind rosa

Die o- bzw. H-Antigene der verwendeten Salmonellen sind auch von der PAA-Platte serologisch eindeutig nachweisbar.

463. Phenolrotplatte

Die Gele werden nach dem System 3212 oder 3213 polymerisiert, dann 6 - 12 Stunden mit je 5 ml der folgenden Lösung überschichtet autoklaviert:

Laktose	1,0 g	
Dextrose	0,1 g	
Phenolrot-Indikatorlösung	2,4 ml	
Bouillon ad	100,0 ml	) pH 7,4

Herstellung der Phenolrotlösung:

Phenolrot (Phenolsulfthalein) 0,1 g wird in 10,0 ml warmem 96 %igen Alkohol gelöst und mit warmem Aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt.
Nach Abgiessen und Abtrocknen kann die Platte beimpft werden. Bei der Phenolrotplatte sieht man im Vergleich zum Kligler-Schrägagar (15)+ einen helleren Rotfarbton.

Tabelle 13.

Der Farbumschlag der Platten nach Beimpfen mit verschiedenen Keimen. Die Ausgangsplatten sind hellrot gefärbt.

Beimpfte Keime	nach 12 Stunden Bebrütung	nach 24 Stunden Bebrütung
Salmonella typi murium	Gel rosa	unveränderte Färbung
E.coli	Gel gelbgrün	intensivere gelbe Färbung
Proteus	Gel rosa	unveränderte Färbung
Pseudomonas	Gel rosa	unveränderte Färbung

464. Bromthymolblau-Platte

4641. Bromthymolblau als Indikator kann verwendet werden:

Beim "Medium für Citratverwertung" (25)⁺.

Die Gele werden wie 463. polymerisiert und für 6 - 12 Stunden mit je 5 ml der folgenden Lösung diffundiert:

NaCl	0,5 g
$MgSO_4$	0,02 g
$(NH_4)H_2PO_4$	0,1 g
K_2HPO_4	0,1 g
Na-Citrat	0,2 g
Bromthymolblau-Indikatorlösung 0,2 %ig	4,0 - 6,0 ml
Bouillon ad	100,0 ml

Herstellung der Bromthymolblaulösung:

Bromthymolblau	1,0 g
1/10 normale NaOH	25,0 ml
Aqua dest. ad	475,0 ml

Die Platten werden bei 120°C, 1 atü 30 Minuten autoklaviert. Nach dem Abgiessen und Abtrocknen sind sie zum Beimpfen bereit (Tabelle 14).

Tabelle 14.

Citraverwertung bei einigen gram-negativen Stäbchen. Abhängigkeit des Farbumschlags von der Bromthymolblaukonzentration. Das pH der Platte liegt zwischen 6,6 - 6,8, sie sind grün gefärbt.

Bromthymolblau-Indikatorlösung	Beimpfte Keime	Nach	12 Stunden Bebrütung	24 Stunden Bebrütung
4 ml	E.coli	Kolonien	grün-gelb	intensivere Färbung
		Gel	gelb	
4 ml	Alcaligenes	Kolonien	grün erhaben	unveränderte Färbung
		Gel	blau	
6 ml	E.coli	Kolonien	grün-gelb	intensivere Färbung
		Gel	grün-gelb	
6 ml	Alcaligenes	Kolonien	grün	intensivere Färbung
		Gel	blau	

4642. Beim "Zucker-Bouillon-Indikator-Gemisch für die Bunte Reihe"

Die Gele werden wie unter 463 polymerisiert und mit Laktose-Bromthymolblau-Indikatorlösung diffundiert (pH 7,2 - 7,4):

Laktose	1,0 g
Bromthymolblaulösung 0,2 %	2,0 - 4,0 ml
Bouillon ad	100,0 ml

Die Platten können nach dem Autoklavieren und Abtrocknen mit folgenden Keimen beimpft werden (Tabelle 15):

Tabelle 15.

Laktoseverwertung bei einigen gramnegativen Stäbchen. Abhängigkeit des Farbumschlags von der Bromthymolblaukonzentration. Das pH der Platte liegt zwischen 7,2 - 7,4, sie sind blau gefärbt.

Bromthymolblau-Indikatorlösung	Beimpfte Keime	Nach 12 Stunden Bebrütung	Nach 24 Stunden Bebrütung
2 ml	E.coli	Kolonien und Gel durchsichtig gelb	intensivere Färbung
2 ml	Alcaligenes	Kolonien und Gel blau	intensivere Färbung
4 ml	E.coli	Kolonien und Gel gelb	intensivere Färbung
4 ml	Alcaligenes	Kolonien und Gel dunkelblau	intensivere Färbung
4 ml	Pseudomonas	Kolonien und Gel grünblau	unveränderte Färbung
4 ml	Proteus	Kolonien grün, Gel blau	unveränderte Färbung

5. DISKUSSION

Die vorliegenden Untersuchungen sollten folgende Fragen bezüglich der Eignung des PAA als Nährboden-Trägersubstanz beantworten:

1. Kann das Gel in einer geeigneten Konsistenz polymerisiert werden, damit man Bakterien darauf ausstreichen kann?
2. Können sterile Nährböden hergestellt werden?
3. Kann der Nährboden frei von Stoffen bereitet werden, die das Bakterienwachstum hemmen?
4. Welche Arten von halbfesten Nährböden können hergestellt werden (Indikatorplatten, Nährböden für die Resistenzbestimmung, Blutplatten, vollsynthetische Nährböden u.a.)?

Durch Abänderung der Konzentrationen der einzelnen Polymerisationskomponenten können Gele verschiedener Konsistenz polymerisiert werden. Die verwendeten Ausgangsmaterialien sind zum Teil für Bakterien toxisch wie Ammoniumperoxodisulfat.
Auch die Monomere oder die Verunreinigungen schädigen die Bakterien in unterschiedlichem Masse. Es handelt sich zum Teil um Enzyminhibitoren (42)+.
Diese toxischen Stoffe müssen entweder neutralisiert oder eliminiert werden. Dies verlangt eine zum Teil umständliche Nachbehandlung. Zur Anpassung des PAA-Gels als bakteriologischer Nährboden müssen in ihm Nährstoffe enthalten sein. Dies kann dadurch erreicht werden, dass die Polymerisationskomponenten in Bouillon gelöst werden, oder indem man die Nährstoffe eindiffundieren lässt.

Im Gegensatz zum Agar können die PAA-Gele im festen Zustand autoklaviert werden. Daraus ergibt sich aber

auch gleich die Schwierigkeit, dass die Gele allein durch Temperaturerhöhung nicht wieder verflüssigt werden können. Dies kann bei der Beseitigung eine Rolle spielen.

Einige gebräuchliche Nährböden können auf PAA-Basis hergestellt werden, nicht so die Blutplatte, der gerade in der bakteriologischen Routinediagnostik eine grosse Bedeutung zukommt. Damit kann das Hämolysevermögen von Bakterien nicht nachgewiesen werden. Auch die pH-Einstellung gestaltet sich umständlich, so dass die Farbumschläge bei Indikatorplatten nicht immer gleich deutlich sind wie auf vergleichbaren Agarplatten.

Bei der Beurteilung der Verwendbarkeit spielen aber folgende Gesichtspunkte eine Rolle:
Das Polyacrylamidgel ist billiger als der Agar, die umständlichere Anpassung als Nährboden könnte bei grosstechnischer Herstellung rationalisiert werden. Gerade bei Stoffwechseluntersuchungen könnte der rein synthetische Charakter des PAA ein Vorteil sein. Es ist nicht bekannt, ob Bakterien existieren, die in der Lage sind, das PAA zu verflüssigen. Einige Bakterien sind beim Agar hierzu in der Lage.

Das PAA-Gel hat eine deutlich kleberigere Oberfläche als Agar. Dies könnte man sich z.B. bei Abklatschmedien zunutze machen; ähnlich Agarstangen könnten solche aus PAA-Gel hergestellt werden.

Nach den vorliegenden Untersuchungen könnte das PAA-Gel Agar nur zum Teil ersetzen, für den breiteren Einsatz jedoch wäre eine grosstechnische Verarbeitung erforderlich. Einige Sonderaufgaben lassen sich mit Nährböden auf PAA-Basis vorteilhaft lösen.

6. ZUSAMMEMFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wird die Herstellung von halbfesten Nährböden mit Polyacrylamidgel als Trägersubstanz behandelt. Die Gele können mit Bouillon polymerisiert werden, oder die nährstofffreien Gele werden mit Bouillon diffundiert.
In jedem Falle ist eine Nachbehandlung der Gele erforderlich, um toxische Komponenten zu neutralisieren oder zu eliminieren. Die meisten der in der medizinisch-bakteriologischen Diagnostik üblichen Nährböden, mit Ausnahme der Blutplatte, können hergestellt werden.
Schwierigkeiten, Einschränkungen und Vorteile bei der Verwendung von Polyacrylamidgel als Trägersubstanz bakteriologischer Nährböden werden diskutiert.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1) Attz u. Hettche, H.O.	"Nährböden und Farben" Berlin 1935
2) Bartel, H. u. Marwyck	"Verfahren zur Rückgewinnung des Agars aus gebrauchten Nährböden" Tierärztl.Rdsch. 48,203-207 (1942)
3) Batchelor, H. u. Wilson	"The use of carbon dioxide in the preparation of Silicic acid jellies" Science (New York N.S.) 87, 172 (1938)
4) Carpenter, E.L. u. Davis, H.S.	"J.appl.chem." 7, 671 (1957)
5) Clauberg, K.W.	"Ist Agar in der bakteriologischen Nährbodentechnik durch Kieselsäuregallerte ersetzbar?" Zbl.Bakter.I Orig. 147, 75-79 (1941)
6) Eick, J.G.	"Einsparung von Agar durch Zusatz von Polyvinylpyrrolidon" Med. Diss. Homburg-Saar (1965)
7) Ferris, T.G.	"Electrophoresis of Serum Proteins in Acrylamide Gel" Amer.J.of Clin.Pathology 38, 4, 383 (1962)
8) Feuer, H. und Lynch, U.E.	"J. Amer.chem.Soc." 75, 5027 (1953)
9) Fischer, G.W.	"Danager, ein vollwertiger Nährbodengrundstoff" Zbl.Bakter.I Orig. 156, 454-457 (1951)
10) Funk, E.	"Über den Ersatz von Agar-Agar durch Pektin bei bakteriologischen Arbeiten" Klin.Wschr. 4, 1546 (1937)
11) Galloway, L.D.	"Some uses of Sheet viscose in microbiological technique" Analyst. 62, 455-456 (1937)

12) Gildemeister, E. 1) "Allgemeine Regeln für die Herstellung von Nährböden" Handbuch der pathogenen Mikroorganismen, Kolle-Kraus-Uhlenhutz 9, 928-931 (1929)

13) Gildemeister, E. 2) "Regenerierung von Agar" Handbuch der pathogenen Mikroorganismen, Kolle-Kraus-Uhlenhutz 9, 1035-1037 (1929)

14) Göpel, H. "Die Verwendung der Stärkeplatte im praktischen Betrieb eines Medizinaluntersuchungsamtes" Med.Diss. Breslau (1940)

15) Hallmann, L. "Bakteriologische Nährböden" 119-120 (1953)

16) Hallmann, L. "Bakteriologische Nährböden" 141 (1953)

17) Hanks, J.H. und Weintraub, R.L. "The Preparation of Silicic Acid Gellies for Bacteriological Media" J.Bact. Baltimore 32, 639-652 (1936)

18) Hettche, H.O. "Erfahrungen mit Kieselsäurenährböden" Zbl. Bakteriol.I Orig. 144, Beiheft, 62-65 (1939)

19) Kanz, E. "Die Ti-Cello-Platte als Agarersatz" Zbl. Bakter. I Orig. 153, 260-264 (1948)

20) Kirschninck, H. "Stellungnahmen zu den Erfahrungsberichten über das einheimische Agar-Präparat Gelar" Dtsch.Gesundhwes. 12, 532-535 (1949)

21) Kisskalt, K. "Filtrierpapier mit Cellophan statt Agar" Arch.Hyg. (D) 1943, 130, 73-76

22) Kühne, H. "Die Untersuchung von Sputum auf Tuberkelbacillen" Centralbl.f.Bakt., Jena 8, 293-297 (1890)

23) Longworth, L.G. — "In Electrophoresis", M.Bier edit., Academic Press, N.Y. 91, (1959)

24) van Marwyck, Ch. — "Die Regeneration des gebrauchten Agars zum vollwertigen Nährbodengrundstoff" Zbl.Bakter. I Orig. 152, 513-518 (1947)

25) "Merck" — "Mikrobiologische Untersuchungsmethode" 59 (1968) E. Merck AG., Darmstadt

26) Meyer, K.H. — "Reindarstellung von Amylose und Amylopektin" Ang.Chemie 7, 155 (1951)

27) Mülhens, K. — "Über Verwendung von Danagar für hochwertige Nährböden" Zbl. Bakter. I Orig. 154, 302-305 (1949)

28) Müller, D. u. Holm, E. — "Herstellung von Kieselgel" Zbl.Bakter. II, 105, 131-133 (1942)

29) Ott, H. — "Elektrophoretische Auftrennung von Serum in Acrylamid-Gel" Die Med. Welt 51, 2696 (1960)

30) "OXOID" — "Handbuch der OXOID-Erzeugnisse für mikrobiologische Zwecke" 65 (1967) OXOID Nährböden u. Chemie GmbH. Wesel

31) Rainer Maurer, H. — "Disk - Elektrophorese" Theorie und Praxis der diskontinuierlichen Polyacrylamidgel-Elektrophorese, Berlin (1968)

32) Raymond, S. u. Weintraub, L. — "Acrylamide Gel as a supporting medium for zone elektrophoresis" Science 130, 711 (1959)

33) Riley, R.F. u. Coleman, M.K. Hokama, Y. — "Clin.chim Acta" 11, 530 (1965)

34) Römpp, H. — "Chemie Lexikon" I. 234 (1962)

35) Römpp, H. — "Chemie Lexikon" III, 3472-3473 (1962)

36) Schulz, R., Renner, G., Henglein, A. u. Kern, W. — "Makromolek. Chem. 12, 20 (1953)

37) Schwarz, P. — "Betrachtungen u. Versuche über die Technik der Wassermann-Reaktion" Zbl.f.Bakt. (Abt. 1) 117, 419-430 (1930)

38) Schütz, F. — "Demonstration eines neuen Nährbodens" Zbl.Bakter. I Orig. 140, Beiheft 118-119 (1937)

39) Sleskin, P. — "Die Kieselsäuregallerte als Nährsubstrat" Zbl.f.Bakt. u.Parasitenk. 10, 209-213, Jena (1891)

40) Smith, E.F. — "Vorführung von Kulturen auf Silikatgelee" Proc.amer.Assoc. Sci. 47, (1898) ref.Zbl. Bakter. II, 15, 242-243 (1905/06)

41) Smith, E.F. — "Kartoffel als Kulturboden" Proc.amer.Assoc.Sci. 47, (1898) ref.Zbl. Bakter. II, 5, 102-104 (1899)

42) Tiesler, E. — "Durchführung der Elektrophorese in Polyacrylamidgel" Das ärztl. Laboratorium, 17, 406-410 (1971)

43) Wahl, R. — "Technique simple de preparation de milieux de cultures synthétiques solides au gel silice" C.r.Soc.Biol. 128, 854-856 (1938)

44) White, M.L. — "The Permeability of Acrylamide polymer Gel" J. Phys. Chem. 64, 1563 (1960)

45) Winogradsky, S. — "Recherches sur les organismes de la nitrification" Ann.d. J´Inst.Pasteur, Par 5, 92-100 (1891)

46) Wohlfeil, T. — "Beiträge zur Erforschung des Oxybiotischen Gasstoffwechsels der Bakterien; über die Abhängigkeit der Atmung der Colibacillus von einigen physikalischen Faktoren" Zbl.f.Bakt. (Abt. 1) 115, (1930)

47) Wohlfeil, T. 1) "Demonstration eines neuen Nährbodens" Zbl.Bakter.I Orig. 140, Beiheft 119 (1937)

48) Wohlfeil, T. 2) "Kieselsäurenährböden zur bakteriologischen Diagnostik von Krankheitserregern" Zbl.Bakter. I Orig. 152, 109-132 (1947)

49) Zimmermann, W. 1) "Feste Nährböden auf Stärkegrundlage als Austausch für Agar-Agar" Zbl.Bakter. I Orig. 143, 142-156 (1938)

50) Zimmermann, W. 2) "Stärkenährböden als Ersatz für Agar-Agar" Klin.Wschr. 1, 27 (1939)

51) Zimmermann, W. 3) "Demonstration neuer Nährböden als Ersatz für Agar" Zbl. Bakter. I Orig. 144, Beiheft 65-70 (1939)

52) Zimmermann, W. 4) "Einsparung von Agar durch Zellulose" Zbl.Bakter. I Orig. 150, 83 - 84 (1943)

53) Zimmermann, W. 5) "Einsparung und Ersatz von Agar" Zbl. Bakter. I Orig. 152, 60-64 (1947)

8. DANKSAGUNG

Hiermit möchte ich Herrn Professor Dr.med. Dr.phil. W. Zimmermann für die Überlassung des Themas verbindlichst danken; auch Herrn Professor Dr.med. E. Tiesler möchte ich für seine Hilfe und zahlreichen Ratschläge bei der Durchführung der Arbeit danken. Herrn Dr.med. H.S. Shu und Herrn Noll, Nährbodenküchenmeister, bin ich für die wertvollen Hinweise und vielfache Unterstützung dankbar verpflichtet.

9. LEBENSLAUF

Am 10.August 1937 wurde ich als Sohn des Bauern Tik-Pen SEAH und seiner Ehefrau Sup-Sah, geborene Oei, in Djatinegara-Djakarta (Indonesien) geboren.

Von 1945 bis 1951 besuchte ich die Volksschule in Bandung (Indonesien). Anschliessend wurde ich Oberschüler der chinesischen Mittel- und Oberschule in Bandung. 1958 legte ich dort mein Abitur ab. Danach begann ich europäische Literatur in Surabaja (Indonesien) zu studieren. Nach drei Semestern Literaturstudium kam ich im Jahre 1960 nach Deutschland. Im Wintersemester 1960/61 habe ich mein Medizinstudium an der Universität Graz (Österreich) angefangen.

Von 1964 bis 1966 habe ich wegen einer persönlichen Angelegenheit mein Medizinstudium in Graz drei Jahre unterbrochen. Im Jahre 1966 setzte ich mein Medizinstudium an der Universität des Saarlandes fort. 1967 legte ich dort das Physikum ab und absolvierte 1970 mein Staatsexamen.